

申请号: 96114246.4 公开号: CN 1186120A

在大肠杆菌中表达作为分泌的重组人干扰素  $\alpha 1b$  蛋白

Express and Secretion of recombinant interferon- $\alpha 1b$  in *E. Coli*.

Abstract:

A secretion type vector with lacUV5 promoter and OmpA signal peptide had been successfully used in expression of exocyto-glucose enzyme of *Cellulomamas fimi* by *E. Coli*, and secreting the product to outside of the cells. And because its perfect characteristics, the secretion type vector also had been used in produce IFN- $\alpha 1b$  and its variants and segments with immunological and biological activity. The present invention describes a recombinant body of lacUV5par8INF and constructive method for its derivatives. The invention also relates to method for produce IFN- $\alpha 1b$  and its variants by integrating the above mentioned vector and its derivatives into transgenic organis and eukaryotic cells, especially strains of *E. Coli*..



附件5b  
[19]中华人民共和国专利局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96114246.4

[51] Int. Cl.<sup>6</sup>

C12N 15/72

C12N 1/21 C12N 15/21

C12P 21/00 C07K 14/56

// (C12N15/72, C12R1:19)

[43] 公开日 1998 年 7 月 1 日

附件5  
[11] 公开号 CN 1186120A

[22] 申请日 96.12.24

[71] 申请人 深圳科兴生物制品有限公司

地址 518057 广东省深圳市南山区科技园谭  
启堂

[72] 发明人 黄允强

权利要求书 1 页 说明书 17.0 页 附图页数 10 页

[54] 发明名称 在大肠杆菌中表达作为分泌的重组人干  
扰素  $\alpha 1b$  蛋白

[57] 摘要

一种采用基因表达的 lacUV5 启动子和 OmpA 信号肽分泌重组蛋白质编码顺序分泌型载体已经有效的在大肠杆菌中表达了 Cellulomonas fimi 细胞外葡萄糖酶并分泌到细胞外。因其很好的特性，已经将分泌载体用于生产干扰素  $\alpha 1b$  蛋白质和具有免疫学和生物学活性的干扰素  $\alpha 1b$  蛋白质变异体和片段。本发明描述了重组 DNA 构建体 lacUV5par8INF 及其衍生物的构建方法，并描述了应用前述分泌载体和其变异体在转基因生物体和原核细胞、特别是在大肠杆菌菌株和/或其培养基中生产干扰素  $\alpha 1b$  和其变异体蛋白质的方法。

(BJ)第 1456 号

## 权利要求书

1. 重组DNA构建体pINF, lacUV5par8INF, 及其衍生物,所述重组DNA构建体pINF的保藏号是CCTCC M96024

5 2. 权利要求1所述的重组DNA构建体lacUV5par8INF的构建方法,该方法是通过将编码干扰素 $\alpha$ 1b蛋白质的基因序列亚克隆到 lacUV5par8cex分泌型载体中而构建,所述重组DNA构建体能够表达干扰素 $\alpha$ 1b活性蛋白质并分泌到细胞外.

10 3. 权利要求1中重组DNA构建体 lacUV5par8INF 的衍生物的构建方法,该方法是通过将干扰素 $\alpha$ 1b基因的突变体或片段亚克隆到 lacUV5par8cex分泌型载体中而形成,其能够表达干扰素 $\alpha$ 1b活性蛋白质的变异体并分泌到细胞外.

15 4. 权利要求1中重组DNA构建体lacUV5par8INF的衍生物的构建方法,该方法是通过将干扰素 $\alpha$ 1b基因或其突变体亚克隆到修饰后的lacUV5par8cex重组DNA构建体中而形成,lacUV5par8cex的修饰是采用原核生物中常用的启动子、核糖体结合序列、ompA前导序列、转录终止子、lacI<sup>q</sup>基因和/或par元件取代lacUV5par8cex中的lacUV5启动子、共有的核糖体结合序列、ompA前导序列、trpA转录终止子、lacI<sup>q</sup>基因和/或par元件而进行的,所述的衍生物均能够表达干扰素 $\alpha$ 1b的活性蛋白质或其变异体,例如采用tac或lac启动子取代  
20 lacUV5启动子,或者用四环素抗性取代氨苄青霉素抗性等.

5. 含权利要求1中任一重组DNA分子的宿主细胞.

6. 含权利要求1中任一重组DNA分子的转基因生物体.

7. 权利要求5中的宿主细胞是原核生物.

8. 权利要求5中的宿主细胞是大肠杆菌菌株.

25 9. 在权利要求5的生物体中生产干扰素 $\alpha$ 1b的方法.

10. 在权利要求5的生物体的培养基中生产干扰素 $\alpha$ 1b的方法.

11. 在权利要求6的生物体中生产干扰素 $\alpha$ 1b的方法.

## 说明书

### 在大肠杆菌中表达作为分泌的重组人干扰素 $\alpha$ 1b蛋白

5 在大肠杆菌细胞内表达的许多天然分泌蛋白容易降解或形成无生物活性的包涵体。但是，通过采用含分泌载体的宿主，可以将它们分泌到细胞周质中。最近，已经研制了将表达产物传递到上清液中的分泌系统。这些系统优于分泌系统的方面在于1)将蛋白水解减少到最少，和2)更方便地用于检测和纯化样品。

10

已经大量研究了采用分泌载体在大肠杆菌中表达重组产物的方法。这些方法包括利用(1)“易漏的”突变菌株(Gikes et al., Bio/Technol., Vol.2, pp 259-263, 1984); (2)与目的产物共表达的溶解蛋白质(Kobayashi et al., J. Bacteriol., Vol.166, pp728-732, 1986); (3)天然分泌的蛋白质或大肠杆菌的外膜组分与目的产物融合(Nagahari et al., EMBO J., Vol.4, pp 3589-3592, 1985; Mackman et al., EMBO J. Vol.6, pp2835-2841, 1987); 和(4)强启动子和高效的前导序列以提供有效的表达和分泌(由未知机制导致分泌)目的产物(Pages et al., J. Bacteriol., Vol.169, pp 1368-1390, 1987; Suominen et al., Gene, Vol.61, pp 165-176, 1987; Guo et al., FEMS Microbiol. Lett., Vol.49, pp279-283, 1988; Wong et al., 美国专利No.5,223,407, 1993; Wong et al., 欧洲专利No. EP0357291 B1, 1996)。在这些方法中，最后一种方式最简单。此外，它使用正常的宿主菌株以便可以得到所需蛋白质的最大表达和最大的细胞生产量。另外，该方法可以利用体内肽酶从信号肽裂解所需产物，由此不需额外的裂解步骤就可从融合蛋白中释放目的产物。

25

利用上述的最后一种方法，构建称为Tac盒(Wong et al., 1993 & 1996上文)的合成分泌盒，以在大肠杆菌中分泌生产重组蛋白。所述Tac盒含有在大肠杆菌中高水平表达蛋白质所必需的所有调节元件，包括杂合的tac启动子，用于转录调节的lac操纵子，共有的核糖体结合位点，omp A前导序列和

trp A转录终止子 (Wong et al.,1993 和1996上文)。为了构建分泌载体, 将Tac盒克隆到pUC18中, 其中还发现了过表达Lac阻遏物的lac I<sup>q</sup>基因和质粒pSC101的分隔元件par (Wong et al.,1993 & 1996上文)。

5 除应用Tac盒大肠杆菌分泌系统生产各种异源蛋白质, 包括hEGF, hPTH, IL-6和甲状旁腺激素相关的肽外 (Wong et al.,1993 & 1996上文; Rabbani et al.,J.Bone Min.Res.,Vol.6[补充1],Abstract 133,S116,1991), 存在IPTG诱导的条件下, 用Tac盒, 表达源于*C.fimi* (O'Neill et al., Gene, Vol.44,pp 325-330,1986a) 的*cex*基因的细胞外葡聚糖酶 (Exg,使用产色底物, 对-硝基苯基- $\beta$ -D-纤维素二糖苷 (pNPC) 可以方便地检测表达产  
10 物。),表达产物的分泌生产将导致细胞迅速死亡 (图1), 然而, 在相同条件下, 没有IPTG时, 表达Exg的细胞以正常速率生长 (图1)。将在Tac盒分泌载体 (上述) 和*cex*基因 (O'Neill et al., 上文) 之间形成的重组构建体称为*tacIQpar8cex* (图2)。

15 非诱导的和诱导的JM101 (*tacIQpar8cex*) 表达的Exg ( $\text{U ml}^{-1}$ ) 总产率方面有很大的差异 (图1和表1), 这可能是由于两种培养物之间活细胞计数的不同 (图3) 而引起的, 但是, 两种培养物分泌的Exg活性 ( $\text{U ml}^{-1}$ ) 很相似 (表1)。结果表明, 两种培养物均不能有效生产细胞外Exg。

20 *tacIQpar8cex*构建体在非诱导条件下, 能够在大肠杆菌中高水平表达Exg, 但是, 在诱导表达Exg后导致的细胞死亡和不能有效分泌Exg (表1) 的结果表明, 它对于分泌生产其他外源蛋白质可能不是最佳的。因此,比tac弱的启动子也许能够更好地用于提高Exg和其他重组蛋白质的表达并分泌到细胞  
25 外。为此选择lac (Hawley et al.,Nucleic Acids Res.,Vol.11,pp 2237-2255,1983)和lacUV5启动子 (Russell et al., Gene, Vol.20, pp.231-243,1982; Silverstone et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., Vol.66, pp 773-779,1970) 来检验上述假设。利用点突变 (Kunkel, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., Vol.82,pp488-492,1985) 技术, 构建两个*tacIQpar8cex*衍生物用于研究, 将其称为

lacIQpar8cex (图4) 和 lacUV5par8cex (图5), 它们分别含有 lac 和 lacUV5 启动子。

与 JM101 (tacIQpar8cex) (图1) 相比, JM101 (lacIQpar8cex) (图6) 和 JM101 (lacUV5par8cex) (图7) 的诱导培养物在生存能力方面均有改善。当评价表达 Exg 的 lacIQpar8cex 和 lacUV5par8cex 构建体的效率时, 两种构建体的培养物只表达了低水平的 Exg 活性 (表1)。数据表明, 这些构建体表达的 lacI<sup>q</sup> 基因的阻遏物严谨地调节着 lac 和 lacUV5 启动子。但是一旦用 IPTG 诱导除去了阻遏, 只有 JM101 (lacUV5par8cex) 的培养物在 Exg 表达方面有明显的增加, 而 JM101 (lacIQpar8cex) 的则没有 (表1)。不仅在细胞内样品中, 而且在培养物上清液样品中也检测到表达产物的增加 (表1)。尽管两种培养物表达的总 Exg 活性 ( $\text{U ml}^{-1}$ ) 有相似的水平 (表1), JM101 (lacUV5par8cex) 诱导培养物分泌 Exg 的活性比未诱导的 JM101 (tacIQpar8cex) 培养物的活性高 4 倍。因此, 可通过诱导 JM101 (lacUV5par8cex) 表达分泌 Exg 的方式, 研究最佳生长条件以得到表达并分泌到细胞外的蛋白质最佳产率。

lacUV5par8cex 构建体表达高水平细胞外 Exg 的能力 (表1和图8) 表明了其在大肠杆菌中表达其他异源蛋白质如干扰素  $\alpha$  1b 并分泌到细胞外的潜在用途。通过取代 cex 基因序列, 已经将人干扰素  $\alpha$  1b 基因的编码序列 (Wu et al., Fundamental & Clinical Trials of Recombinant Drugs, People's Health Press, p.155, 1996) 克隆在 lacUV5par8cex 构建体中 (图9)。克隆和诱变操作后, 在最终的分泌构建体中将干扰素  $\alpha$  1b 基因与 ompA 前导序列准确地融合在一起, 称为 lacUV5par8INF (图10)。用免疫学和生物学试验 (表2) 已经确定了用 lacUV5par8INF 的构建体 (称为 pINF, 图9) 成功地表达了干扰素  $\alpha$  1b 蛋白质。

根据本发明, 我们提供了重组 DNA 构建体 lacUV5par8INF 及其衍生物, 重组 DNA 构建体 lacUV5par8INF 的保藏号为 CCTCC M96024。所述的重组 DNA 构

建体及其衍生物在原核细胞、特别是在大肠杆菌菌株中表达干扰素 $\alpha$ 1b蛋白质和/或具有干扰素 $\alpha$ 1b蛋白质免疫活性和/或生物活性的干扰素 $\alpha$ 1b蛋白质的变异体。由转化的细胞表达的干扰素和/或其变异体被分泌到培养基中，用免疫学方法和/或生物学方法试验可以对其进行检测。还可以用标准层析技术  
5 纯化干扰素和/或其变异体，然后采用聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）分析纯化的产物。

根据本发明，我们提供了重组DNA构建体lacUV5par8INF的构建方法，该方法是通过将编码干扰素 $\alpha$ 1b蛋白质的基因序列亚克隆到 lacUV5par8cex分泌  
10 型载体中而构建，所述重组DNA构建体能够表达干扰素 $\alpha$ 1b活性蛋白质并分泌到细胞外。

根据本发明，我们提供了重组DNA构建体 lacUV5par8INF 的衍生物的构建方法，该方法是通过将干扰素 $\alpha$ 1b基因的突变体或片段亚克隆到  
15 lacUV5par8cex分泌型载体中而形成，其能够表达干扰素 $\alpha$ 1b活性蛋白质的变异体并分泌到细胞外。就免疫活性和/或生物活性而言，该变异体在功能上等同于天然干扰素 $\alpha$ 1b蛋白质。

根据本发明，我们提供了重组DNA构建体lacUV5par8INF的衍生物的构建  
20 方法，该方法是通过将干扰素 $\alpha$ 1b基因或其突变体亚克隆到修饰后的lacUV5par8cex重组DNA构建体中而形成，lacUV5par8cex的修饰是采用原核生物中常用的启动子、核糖体结合序列、opmA前导序列、转录终止子、lacI<sup>q</sup>基因和/或par元件取代lacUV5par8cex中的lacUV5启动子、共有的核糖体结合序列、opmA前导序列、trpA转录终止子、lacI<sup>q</sup>基因和/或par元件而进行的，所  
25 述的衍生物均能够表达干扰素 $\alpha$ 1b的活性蛋白质或其变异体，例如采用tac或lac启动子取代lacUV5启动子，或者用四环素抗性取代氨苄青霉素抗性等。



本发明还包括源于lacUV5par8INF的任何突变体,及源于lacUV5par8INF异构体(如改变其氨苄青霉素抗性为其他选择标记,例如四环素抗性标记)的任何突变体,表达干扰素 $\alpha$ 1b蛋白质或其变异体。

5 根据本发明还可将lacUV5par8INF或其衍生物转入转基因生物体中表达干扰素 $\alpha$ 1b的活性蛋白质或其变异体。

现在参考下列附图举例说明本发明。

10 图1说明用Tac盒构建的tacIQpar8cex构建体(如图2所示)在大肠杆菌JM101菌株中,经(-■-)或不经(-□-)IPTG诱导表达后细胞外Exg活性。诱导过程为,在2X YT培养基中,30℃约200 RPM振荡培养细胞,在A550值约为0.3时,加入IPTG达到0.1 mM的终浓度。所列的数据是来自不同试验(n=3)的平均 $\pm$  SEM值。

15 图2是表达Exg的tacIQpar8cex构建体的图示。标明了成熟Exg(cex)的编码序列,过表达Lac阻遏物的基因(lacI<sup>q</sup>),来自pSC101的分隔元件(par),以及氨苄青霉素抗性(Amp<sup>R</sup>)的bla基因。标明了Tac盒的元件: tacP = tac启动子, lacO = lac操纵子, RBS = 核糖体结合位点, ompA = ompA  
20 前导序列, STOP = 在三个阅读框架中的串联终止密码子, term = 转录终止子。分别用阴影棒和箭头表示cex基因的非编码区和基因表达的方向。

图3(A)表示经或未经IPTG诱导的大肠杆菌JM101(tacIQpar8cex)的存活计数。诱导条件与在图1说明中描述的相同。细菌计数在2X YT平皿和含氨苄青霉素的2X YT琼脂平皿上完成。(--□--)标明了未经IPTG诱导培养的大肠杆菌JM101(tacIQpar8cex)在2X YT琼脂平皿的存活计数。(-□-)标明了未经IPTG诱导培养的大肠杆菌JM101(tacIQpar8cex)在含氨苄青霉素2X YT琼脂平皿的存活计数。(--■--)标明了经IPTG诱导培养的大肠杆菌JM101(tacIQpar8cex)在2X YT琼脂平皿的存活计数,(-■-)标明了经IPTG诱

导培养的大肠杆菌JM101 (tacIQpar8cex) 在含氨苄青霉素2X YT琼脂平皿的存活计数。图3 (B) 表示诱导对宿主细胞致死作用的放大图。

图4说明表达Exg的lacIQpar8cex构建体。在该构建体中所示的所有元件均与图2对tacIQpar8cex构建体说明中描述的相同，除用lac启动子 (lacP) 代替tac启动子外。

图5说明表达Exg的lacUV5par8cex构建体。在该构建体中所示的所有元件均与图2对tacIQpar8cex构建体注释中描述的相同，除用lacUV5启动子 (lacUV5P) 代替tac启动子外。

图6表示经或未经IPTG诱导的大肠杆菌JM101 (lacIQpar8cex) 的存活计数。诱导条件与在图1说明中描述的相同。细菌计数在2X YT平皿和含氨苄青霉素的2X YT琼脂平皿上完成。(--□--)标明了上未经IPTG诱导培养的大肠杆菌JM101 (lacIQpar8cex) 在2X YT琼脂平皿的存活计数。(- □ -) 标明了未经IPTG诱导培养的大肠杆菌JM101 (lacIQpar8cex) 在含氨苄青霉素2X YT琼脂的平皿存活计数。(--■--) 标明了经IPTG诱导培养的大肠杆菌JM101 (lacIQpar8cex) 在2X YT琼脂平皿的存活计数，(- ■ -) 标明了经IPTG诱导培养的大肠杆菌JM101 (lacIQpar8cex) 在含氨苄青霉素2X YT琼脂平皿的存活计数。

图7表示经或未经IPTG诱导的大肠杆菌JM101 (lacUV5par8cex) 的存活计数。诱导条件除了在A550值约为1.2时,加入IPTG外,其他均与在图1说明中描述的相同。细菌计数在2X YT平皿和含氨苄青霉素的2X YT琼脂平皿上完成。(--□--)标明了上未经IPTG诱导培养的大肠杆菌JM101 (lacUV5par8cex) 在2X YT琼脂平皿的存活计数。(- □ -) 标明了未经IPTG诱导培养的大肠杆菌JM101 (lacUV5par8cex) 在含氨苄青霉素2X YT琼脂平皿的存活计数。(--■--) 标明了经IPTG诱导培养的大肠杆菌JM101 (lacUV5par8cex) 在2X YT琼脂平皿的存活计数，(- ■ -) 标明了经IPTG诱导培养的大肠杆菌

诱导培养的大肠杆菌JM101 (lacUV5par8cex) 在含氨苄青霉素2X YT琼脂平皿的存活计数.

5 图8表示在经 ( - ■ - ) 或未经 ( - □ - ) IPTG诱导培养的大肠杆菌JM101菌株中, 由lacUV5par8cex构建体 (如图5所示) 表达的细胞外Exg活性. 在图7的注释中有诱导条件. 所列的数据是来自不同试验 (n = 3) 的平均值  $\pm$  SEM.

图9说明表达干扰素  $\alpha$  1b蛋白质的重组pINF构建体的构建过程.

10

图10说明表达干扰素  $\alpha$  1b蛋白质的lacUV5par8INF构建体的构建过程.

## 实施例1

### 材料和常规技术

15

#### (a) 大肠杆菌菌株和培养基

20 分别用大肠杆菌菌株JM101 (Yanisch et al., Gene, Vol.33, pp 103-119, 1985) 和BW313 (Kunkel, 同上文) 表达并增殖质粒和噬菌体, 并用于DNA分子的点突变. 从Promega购买大肠杆菌BHM 71 - 18 mutS( $\Delta$  [lac-proAB], thi, supE, mutS215::Tn10; F' [lacI<sup>q</sup>, lacZ  $\Delta$  M15, proAB<sup>+</sup>]), 按供应商的说明用于双链(ds)DNA诱变.

25 按前述 (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, N.Y., 1989) 制备用于培养并维持大肠杆菌菌株的2X YT和M9培养基. 培养基中加入4-羟甲基香豆素  $\beta$  - D - 纤维二吡喃糖 (MUC, Sigma) 达到0.1 mM的终浓度, 用于检测从菌落分泌的Exg活性. 用含70  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> 氨苄青霉素培养基筛选质粒转化的表现Amp<sup>R</sup>表型的细胞和存活细胞, 用于时间过程研究.

#### (b) 质粒和噬菌体构建体

编码成熟*C.fimi* 的Exg的cex基因可以从质粒pBR325,p510.507(Curry et al.,ApplEnviron.Microbiol.,Vol.54,pp 476-484)的衍生物中的1.8-kb Eco RI-Hin dIII片段中得到。质粒lacIQpar8 (Wong et al.,1993 & 1996,同上)和pBVX $\alpha$  1b[pBV867的异构体 (Hau,Molecular Virology ,pp 635-636,Ke Yun Publication Co.,1990) ]用于构建cex基因的表达及分泌载体和提供干扰素 $\alpha$  1b的基因已在有关的报道中提及。通过将修饰的Tac盒 (Wong et al.,1993 & 1996,同上文) (其中缺失tac启动子) 亚克隆到M13mp18噬菌体载体 (Yanisch et al.,同上文) 的Eco RI和Hin dIII位点而构建载体RH1 (未发表的结果)。该噬菌体构建体有利于DNA分子的诱变。

10

### (c)DNA操作

采用常规方法 (Sambrook et al.,同上文) 完成重组DNA技术, 包括限制酶消化, DNA修饰, 细胞转化和转染, 常规的和低熔点的琼脂糖凝胶电泳。单链DNA分子的点突变按已发表的方法进行 (Kunkel, 同上文)。除了用尿嘧啶取代的DNA作为模板之外, 双链DNA的突变基本上按照Deng和Nickoloff (Anal.Biochem.Vol.200,pp 81-88,1992) 的点缺失 (USE) 方法完成。用含尿苷的 ( $0.5 \text{ ug ml}^{-1}$ ) 2X YT培养基培养的大肠杆菌BW313菌株制备尿苷取代的DNA, 然后通过CsCl - 梯度离心 (Sambrook et al.,同上文) 纯化。通过双脱氧测序法 (Sanger et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., Vol.74, pp5463-5467,1977) 确定所得的突变。

20

## 实施例2

### 构建重组质粒

#### 25 (a)构建表达*c.fimi* Exg的质粒

质粒lacUV5par8cex的tacIQpar8cex (图1) 构建方法如下:

用Eco RI和Pst I酶切质粒p510.507, 得到含cex 基因5' 末端区的0.7 kb片段, 用T4 DNA聚合酶补平其末端。将该片段克隆到RH1的Eco RV位点以使cex 基因的5' 部分放在ompA前导序列的下游。该产物称为中间体I, 由于cex

基因与ompA前导序列的融合不精确，使用50bp诱变引物OMPAEXO（5'-CGGCG GCCTC CTTGA GCGTG GTCGC GGCCT GCGCT ACGGT AGCGA AACCA-3'）对其进行突变。所述引物5'末端的前25个碱基与编码成熟Exg产物的cex基因编码链的前25个碱基互补，而所述引物3'末端的后25个碱基与ompA前导序列编码链的后25个碱基退火。在中间产物I构建体中两个退火片段之间不互补序列在诱变过程中除去，以得到在cex和ompA序列之间准确的融合。所得的产物，称为中间产物II，用Pst I完全消化，用Nru I部分消化以得到0.7 -kb片段，然后与载体lacIQpar8（用相同的酶消化）连接，以形成下一个中间产物，tacIQpar8cex'。为了重建cex的完整编码序列，从部分消化的tacIQpar8cex'构建体中分离的较大的Xmn I-Pst I片段与部分消化的p510.507质粒纯化的较小的Xmn I-Pst I片段（1.5-kb）连接。将与lacIQpar8中cex基因完全重建的构建体称为tacIQpar8cex。

用USE方法（Deng et al., 同上文），代替tacIQpar8cex构建体中由于cex转录表达的启动子。含lac（Hawley et al., 同上文）或lacUV5启动子（Russell et al., 同上文）的诱变衍生物分别称为lacIQpar8cex和lacUV5par8cex，用寡核苷酸NATACLAC（5'-CCGCA TACTT ACTCC CCATA CCCCT GTTTA CACTT TATGC TTCCG GCTCG TATGT TGTGT GGAAT TGTGA GCGGA TAACA ATTC-3'）或寡核苷酸TACUV5（5'-GCATA CTTAC TCCCC ATCCC CCTGT TTACA CTTTA TGCTT CCGGC TCGTA TAATG TGTGG AATTG TG-3'）作为引物得到的。划线的六聚体指这些引物中启动子的-35和-10区。

#### (b)构建表达干扰素 $\alpha$ 1b的质粒

将含干扰素 $\alpha$ 1b基因质粒pBVX $\alpha$ 1b（Hau, 同上文）的EcoRI-PstI片段，克隆到已经用EcoRV加PstI消化的RH1载体（实施例2a）中以形成重组构建体RH1INF，其中干扰素 $\alpha$ 1b基因在Tac盒（Wong et al., 1993 & 1996, 同上文）中与ompA前导序列融合，在分离两个遗传元件的克隆过程中形成7个多余密码子的序列。然后将ompA-干扰素 $\alpha$ 1b基因融合作为NruI-PstI片段亚克隆到已经用两种相同的酶消化的lacUV5par8cex构建体（图5）中以形成中间构建

体pINF（图9），该构建体能够表达干扰素 $\alpha$ 1b类似物，在大肠杆菌表达的该类似物的成熟蛋白质的N-末端含7个外源的氨基酸。

为了形成表达干扰素 $\alpha$ 1b的最终构建体，lacUV5par8INF，用寡核苷酸INF（5'-ATCCA GGCTG TGGGT CTCAG GGAGA TCA $\overline{C}$ A GGCCT GTGCT  
5 ACGGT AGCGA AACCA GCCAG-3'）作为诱变引物，首先缺失在RH1INF构建体中分开ompA前导序列和干扰素基因序列的7个密码子。用NruI和PstI酶切诱变产物，所述产物含有与ompA序列精确融合的干扰素基因，然后将含ompA-干扰素基因融合片段亚克隆到已经用相同的两种酶消化的lacUV5par8cex构建体（图5）中以形成最终的构建体lacUV5par8INF（图  
10 10），认为该构建体能够在大肠杆菌中表达经加工的成熟干扰素 $\alpha$ 1b蛋白质。

### 实施例3

#### 检测重组产物

15

#### (a)Exg分泌的持续研究和活性检测

在各研究中，用来自新鲜转化的菌落作为接种物。在30℃保温接种的培养基，以约200RPM振荡达到所需的A<sub>550</sub>值（表1和附图的注释）。将培养物分成两部分。一部分（诱导的培养物）加入IPTG达到0.1 mM的终浓度，而另一  
20 部分（未诱导的）不诱导。将两种培养物均按前述保温培养，以两小时的间隔取样进行活性检测、活细胞计数和A<sub>550</sub>浊度测量。为了制备细胞溶解产物，用一半体积的磷酸盐缓冲液（Sambrook et al., 同上文）将细胞沉淀洗涤两次，然后重悬在一体积的相同缓冲液中，最后以16000psi的压力通过French pressure mini-cell(SLM Instruments Inc., IL, USA)3次将其溶解。

25 现有技术已经描述了（Curry et al., Appl. Environ. Microbiol. Vol. 54, pp 476-484, 1988）用于荧光检测Exg活性的MUC平皿试验（MUCase）方法。如下检测Exg对pNPC(Gilkes et al., J. Biol. Chem., Vol. 250, pp 10455-10459)的水解活性（pNPCase）。通常，将20  $\mu$ l 试验缓冲液(100 mM磷酸钠, pH7.0)和100  $\mu$ l 25 mM的pNPC加到100  $\mu$ l适当稀释的样品中。将所述混合物在37℃保温30分

钟，然后通过加入1 毫升100 mM碳酸钠溶液停止反应。在407nm测量最终产物的吸收值。一单位pNPCase每分钟产生1nmol对 - 硝基苯酚。用Bradford的方法 (Anal.Biochem.,Vol.72,pp248-254,1976) 确定蛋白质浓度。

#### 5 (b) 干扰素 $\alpha$ 1b的免疫学和生物学试验

按照现有技术所述的 (Zhang et al.,Bioproducts J.China,Vol.7,pp 73-75,1994) 使用两种抗干扰素  $\alpha$  1b的单克隆抗体的两抗体夹心方法, 对重组干扰素  $\alpha$  1b进行免疫学检测。简而言之, 首先用100  $\mu$  l包被抗体 (以20  $\mu$  g/ml的浓度) 覆盖一96孔平板, 然后在37 $^{\circ}$ C保温2小时。除去抗体后, 用在Tris缓冲液 (pH7.4) 中的0.05%吐温将孔洗涤两次。然后将各培养物上清液样品一式两份加到两孔中, 将所述平板在37 $^{\circ}$ C保温30分钟。用0.05%吐温缓冲液将孔洗涤三次, 每孔加入辣根过氧化物酶结合的抗体, 在37 $^{\circ}$ C保温30分钟, 每孔用吐温缓冲液洗涤3次, 然后在每孔中加入一滴新鲜制备的底物混合物 (用在柠檬酸缓冲液中以0.5  $\mu$  g/ml浓度制备的OPD底物溶液将30% 过氧化氢稀释1000倍)。通过向各孔中加入一滴2 M硫酸来终止方法。在470nm测量最终反应混合物的吸收值。参考用纯化的干扰素  $\alpha$  1b制备的标准曲线确定样品中干扰素的浓度。

参考现有技术所述的 (Personal communication from Shanghai Bioproduct Research Institute) 的干扰素保护WISH细胞抵御病毒攻击的能力来确定干扰素  $\alpha$  1b的生物活性。将一单位干扰素的生物活性定义为最大稀释1 ml干扰素样品可以保护50% 的WISH细胞免于因病毒攻击而引起的病变 (Personal communication from Shanghai Bioproduct Research Institute)。

#### 结果

25

##### A 构建tacIQpar8cex

用Tac盒 (Wong et al., 1993 & 1996, 同上文) 有效地分泌各种相对小的 (<22 kD) 异源蛋白质提示, 它可以促进较大蛋白质如49-kD C.fimi Exg (O'Neill et al., 1986a, 同上文) 的分泌。就该酶的N - 末端是催化活性所必需的

(Warren et al., proteins, Vol.1, pp 335-341, 1986) 事实来说, 确定将 Exg 的编码序列, cex (O'Neill et al., 1986a, 同上文) 在框架中融合, 并在 Tac 盒中紧接在 ompA 序列后, 希望从融合蛋白中精确地裂解掉 OmpA 信号肽以达到活性的分泌 Exg 产物。用分泌构建体之一, lacIQpar8 (Wong et al., 1993 & 1996, 同上文) 作为载体表达 cex 基因。在一系列的有关亚克隆和定点诱变操作 (实施例 2a) 后, 将 cex 基因与在 lacIQpar8 中的 ompA 精确地融合以形成分泌质粒, lacIQpar8cex (图 2)。

#### B 由 lacIQpar8cex 构建体表达并分泌 Exg

筛选表达 Exg 的 JM101 (lacIQpar8cex) 时, MUC 平皿在 UV 辐射下, 菌落周围的荧光晕环的存在 (未列出数据) 表明成功地表达了 Exg。以两小时时间隔收集 JM101 (lacIQpar8cex) 诱导的 (用 IPTG) 和未诱导的 (不用 IPTG) 培养物, 对样品中 Exg 的分布进行分析。尽管没有用 IPTG 诱导, 但是在 JM101 中 Tac 盒仍然很强地表达了 cex 基因。测定在 12 小时时间点收集的非诱导样品的 Exg 活性 (表 1), 在此阶段, 所述培养物处于后对数生长期 (数据未列出)。酶水平比使用其他系统 (Curry et al., 同上文; O'Neill et al., Appl. Environ. Microbiol., Vol. 52, pp 737-743, 1986b) 的以前报道的水平高 2 - 11 倍。此外, 在诱导的和非诱导的上清液样品中均检测到显著的活性水平 (图 1), 这表明了 OmpA 能够将 Exg 引导至周质中, 并从周质中分泌到上清液中。

由于在 Tac 盒构建体中存在 lacI<sup>q</sup> 基因元件 (图 2), 所以在没有 IPTG 诱导时, 异源蛋白质的在 JM101 菌株中的表达就要受到严格的阻遏 (未公开的数据)。这样的调节可以诱导高密度培养物高水平地表达重组蛋白质。出乎意料地注意到甚至不进行诱导时, JM101 (lacIQpar8cex) 也表达很强的 Exg, 而且诱导的培养物表达的总活性比其“阻遏”的对应物低很多 (表 1)。所述结果表明 Exg 的过表达对于大肠杆菌细胞可能是有害的。此外, 大量产生的 Exg 以溶解的形式存在。

尽管从非诱导的和诱导的 JM101 (lacIQpar8cex) 中表达的 Exg 的总产率 ( $\text{U ml}^{-1}$ ) 有很大的不同, 但是两者分泌的 Exg 活性 ( $\text{U ml}^{-1}$ ) 很相似 (表



1) . 这表明这两者培养物都不能有效地生产细胞外Exg.

### C IPTG诱导对JM101 (tacIQpar8cex) 细胞生存能力的有害作用

5 为了研究Exg对JM101 (tacIQpar8cex) 生长的抑制作用, 在时间过程研究 (图1) 中与Exg表达同时监测菌株的生存能力 (图3). 尽管在非诱导条件下所述培养物正常生长, 但是IPTG的加入引起细胞迅速死亡, 正如细胞不能在培养皿中生长 (图3) 所表明的. 存在IPTG时, 不是所有的细胞都立即死亡, 没有被完全诱导的那些能保持存活 (图3B). 这些细胞与可能只分裂几代, 而且细胞计数无法登记的那些细胞一起在诱导生长后前期 (前8个小时), 有可能引起分泌的Exg活性的显著增加 (图1). 在生长后期 (图1) 10 中检测到的Exg活性的轻微增加可能是由于少量活细胞的表达 (图3B) 而引起的, 所述细胞可能是部分诱导的细胞或只含有少量tacIQpar8cex构建体拷贝的细胞.

### 15 D 利用较弱的启动子增强Exg表达

尽管tacIQpar8cex构建体能够在大肠杆菌中表达高水平Exg, 但它不能提供可控制的Exg表达模式并有利于所述酶的有效分泌 (表1) 使得它不适于分泌生产Exg. Exg表达的致死作用说明可以用比tac弱的启动子更好地增强细胞外Exg的生产. 在研究中使用了两种启动子lac (Hawley et al., 同上文) 和lac 20 UV5 (Russell et al., 同上文), 后者是前者对降解不敏感的突变体.

利用点突变技术 (Kunkel, 同上文) 和用于诱变双链DNA分子的USE (Deng et al., 同上文), 通过分别使用NTACLAC和TACUV5 (实施例2a) 构建了tacIQpar8cex的两个衍生物, 称为lacIQpar8cex和 lacUV5par8cex. 两个构建体除在lacIQpar8cex中的启动子为lac和 lacUV5par8cex的启动子为lacUV5 25 外, 均与tacIQpar8cex相同.

### E JM101 (lacIQpar8cex) 和JM101 (lacUV5par8cex) 的生长研究

在两个新构建体中表达cex基因的弱启动子lacIQpar8cex和 lacUV5par8cex能够使宿主培养物在没有IPTG时保持正常生长, 还可使其在诱导物存在时保

持良好的生长（图6&7）。JM101（lacIQpar8cex）和JM101（lacUV5par8cex）的诱导培养物与JM101（tacIQpar8cex）（图3）相比，细胞的生存能力得到改善。不过，lacUV5par8cex构建体的诱导仍对其宿主有一些致死作用（图7），对采用较低效率的lac启动子在JM101（lacIQpar8cex）中表达Exg似乎对细胞没有任何有害的作用（图6）。

尽管在诱导的JM101（lacIQpar8cex）培养物中得到的活细胞的计数比其非诱导对应底物少，但是在所有的检测时间点，实际的细胞计数是相当高的（图7）。另一点值得注意的是，在诱导的JM101（tacIQpar8cex）培养物（图3）中发现的质粒的令人惊奇的矫正在JM101（lacUV5par8cex）（图4）中并未观察到。

#### F 用构建体 lacUV5par8cex 提高细胞外 Exg 的生产

评价lacIQpar8cex和lacUV5par8cex构建体在表达Exg时的效率。正如由从JM101（lacUV5par8cex）培养物（图8和表1）中得到的结果所表明的，在没有IPTG诱导时，两种构建体的培养物只表达低水平的Exg活性。数据表明，lac和lacUV5启动子均紧紧地被在这些构建体共表达的lacI<sup>q</sup>基因的阻遏物所抑制。但是，一旦通过IPTG诱导除去阻遏后，培养物（lacUV5par8cex）（图8和表1）而不是JM101（lacIQpar8cex）（表1）的Exg生产有明显的提高。不仅在细胞内样品中检测到这种提高，而且在培养物上清液中更明显（图8和表1）。诱导的JM101（lacUV5par8cex）分泌的Exg活性是非诱导的JM101（tacIQpar8cex）培养物（图1）的四倍之多，尽管两种培养物表达的总Exg活性（U ml<sup>-1</sup>）水平相似（表1）。

在整个时间过程研究（图3）中都在非诱导的JM101（tacIQpar8cex）中记录到高密度的活细胞，可能能够解释从不完全阻遏的tac启动子表达的，检测的（表1）高水平的总Exg。但是如果比较Exg的特异性活性（以蛋白质重量（表1）为基础得到的）或细胞计数，很清楚的是（特别是在上清液样品中）后者培养物比前者更有生产力。甚至可以从经延长IPTG诱导（图8）的JM101（lacUV5par8cex）培养物中得到高水平的Exg。

#### G 用pINF构建体表达并分泌干扰素 $\alpha$ 1b

使用pINF构建体（实施例2b和图9），用以前描述的（实施例3b）免疫学和生物学方法确定在大肠杆菌中表达干扰素的研究。确定在 $A_{550} = 0.5$ 的细胞密度，用1mM IPTG诱导12小时和14小时的JM101（pINF）的上清液样品中是否存在干扰素活性。尽管构建体pINF可能只产生在常数蛋白质N-末端含7个额外氨基酸的干扰素  $\alpha$  1b的类似物（比真正干扰素的抗原性和生物活性低），单来自两种试验的结果表明在上清液样品中存在免疫和生物学活性（表2）。另外，我们的结果第一次表明干扰素  $\alpha$  1b可以在大肠杆菌中表达并分泌到细胞外。

10

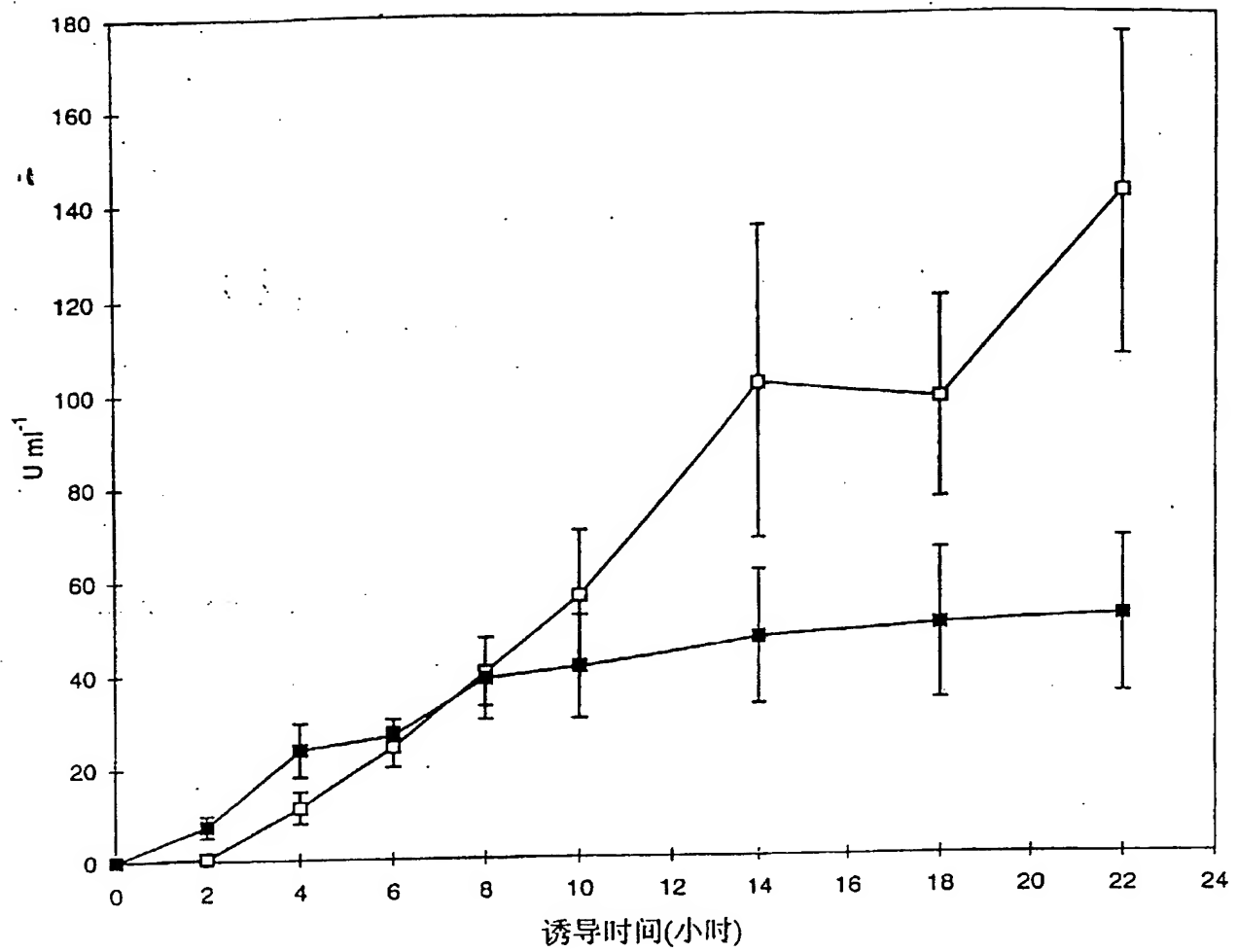
表一 不同重组构建体表达 Exg 的活性

重组构建体	诱导物	比活(U 毫克蛋白 <sup>-1</sup> )		活性(U 毫升 <sup>-1</sup> )		活性百分比	
		细胞内	培养基上清	细胞内	培养基上清	细胞内	培养基上清
tacIQpar8cex	-	289.3	494.5	561.2	65.5	89.5	10.5
tacIQpar8cex	+	5.0	222.5	2.6	58.2	4.3	95.7
lacIQpar8cex	-	22.0	23.5	9.6	0.8	92.3	7.7
lacIQpar8cex	+	55.2	90.2	31.3	3.4	90.2	9.8
lacUVpar8cex	-	110.9	63.3	77.3	1.8	97.7	2.3
lacUVpar8cex	+	403.1	1045.4	273.9	248.1	52.5	47.5

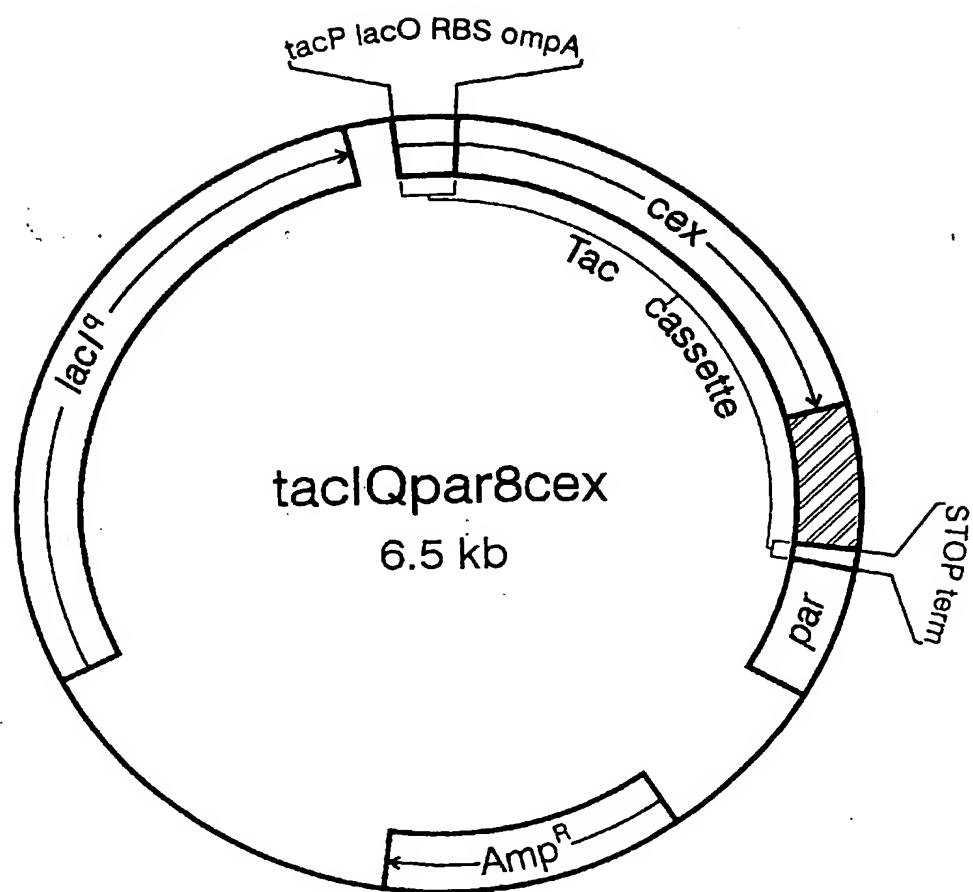
含不同重组构建体的 JM101 菌株在含有氨苄青霉素的 2X YT 培养基中生长到 A550 为 0.3 时加入或不加入终浓度为 0.1mM 的 IPTG 诱导物后,继续培养 12 小时后测定 Exg 的活性.

5 表二 JM101(pINF)培养物上清中干扰素的活性

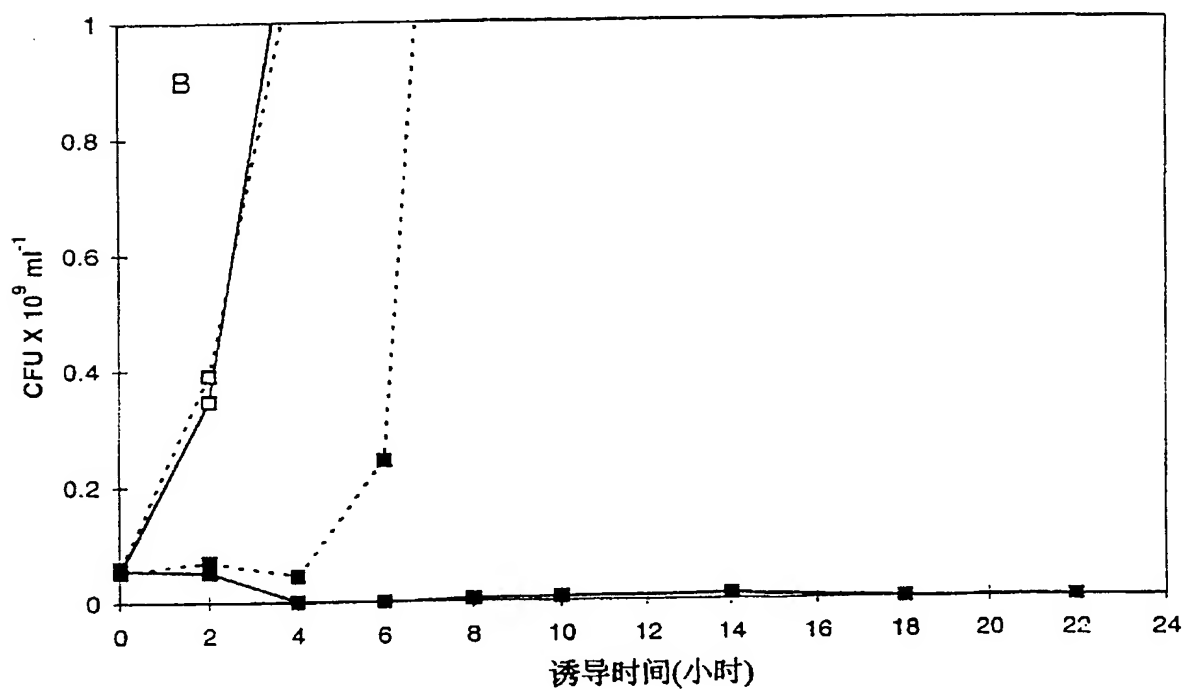
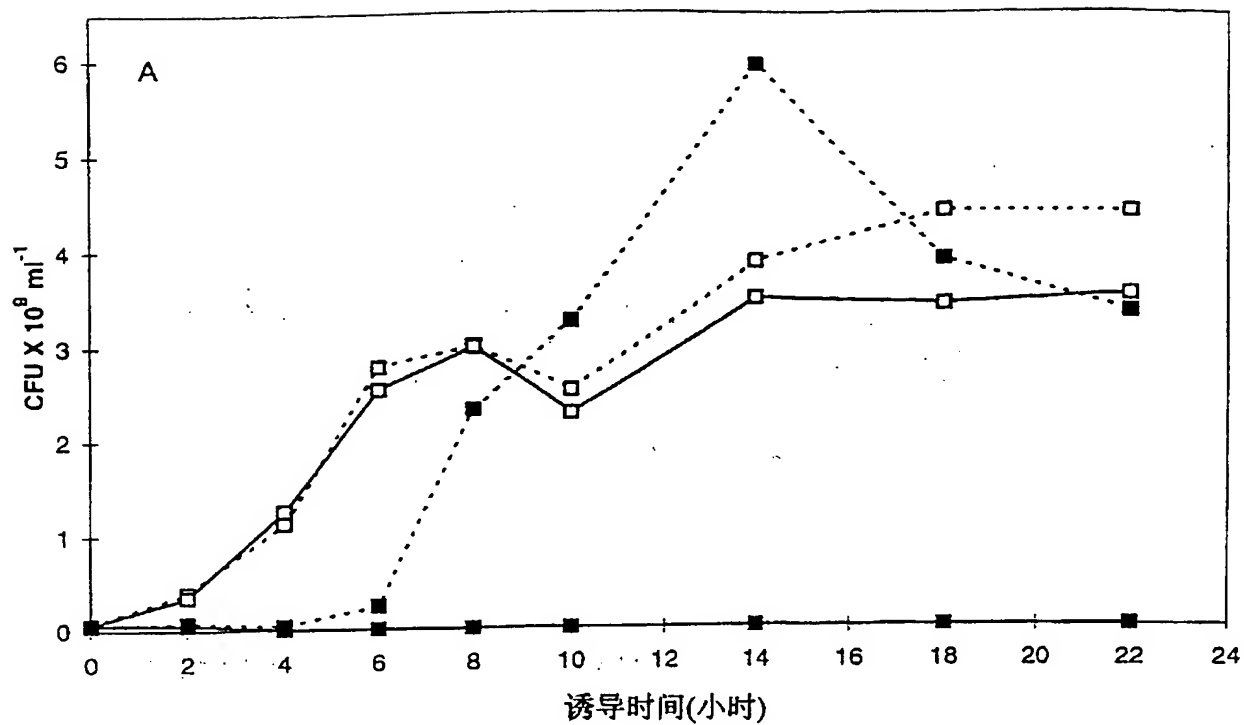
样 品	IPTG 诱导	免疫活性( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	生物活性( $\text{IU ml}^{-1}$ )
1	12 小时	0.020	194
2	24 小时	0.021	162



图一

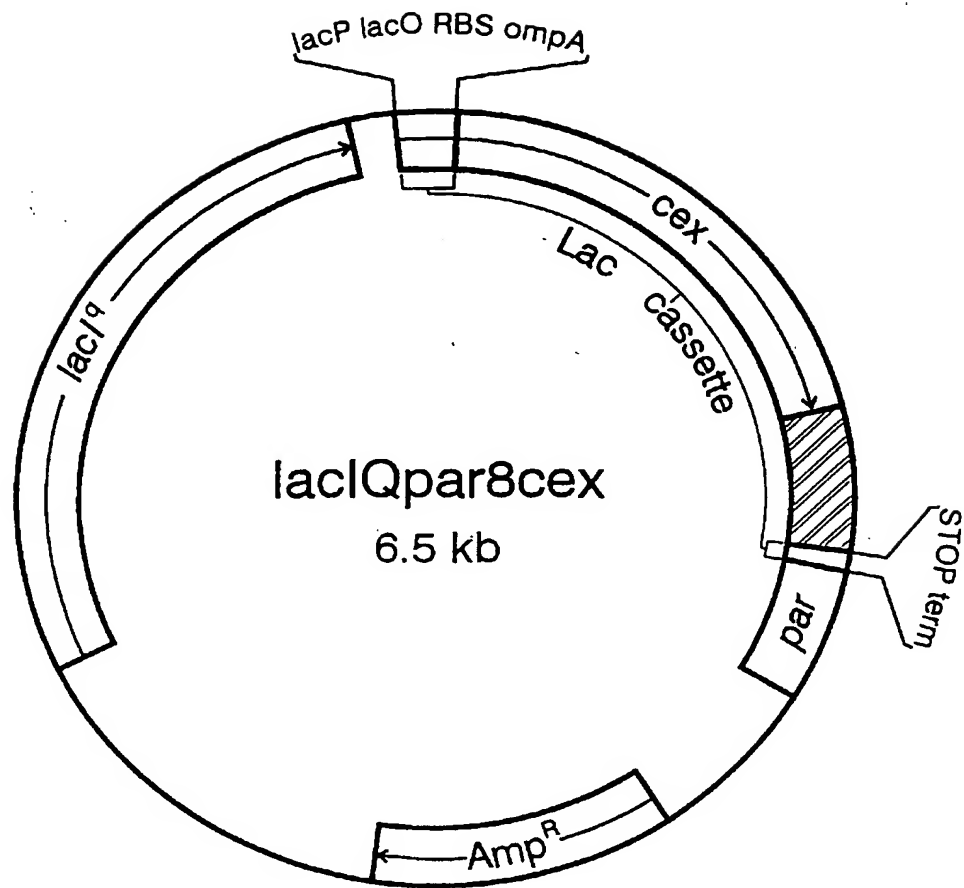


图二

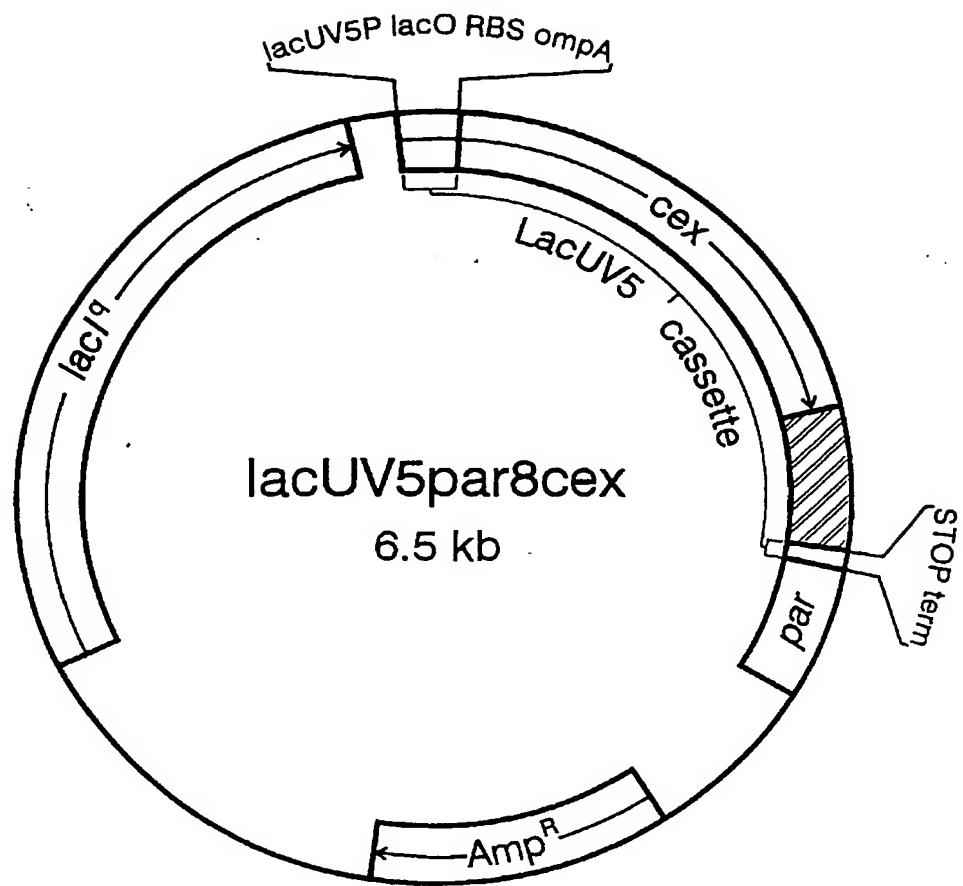


图三

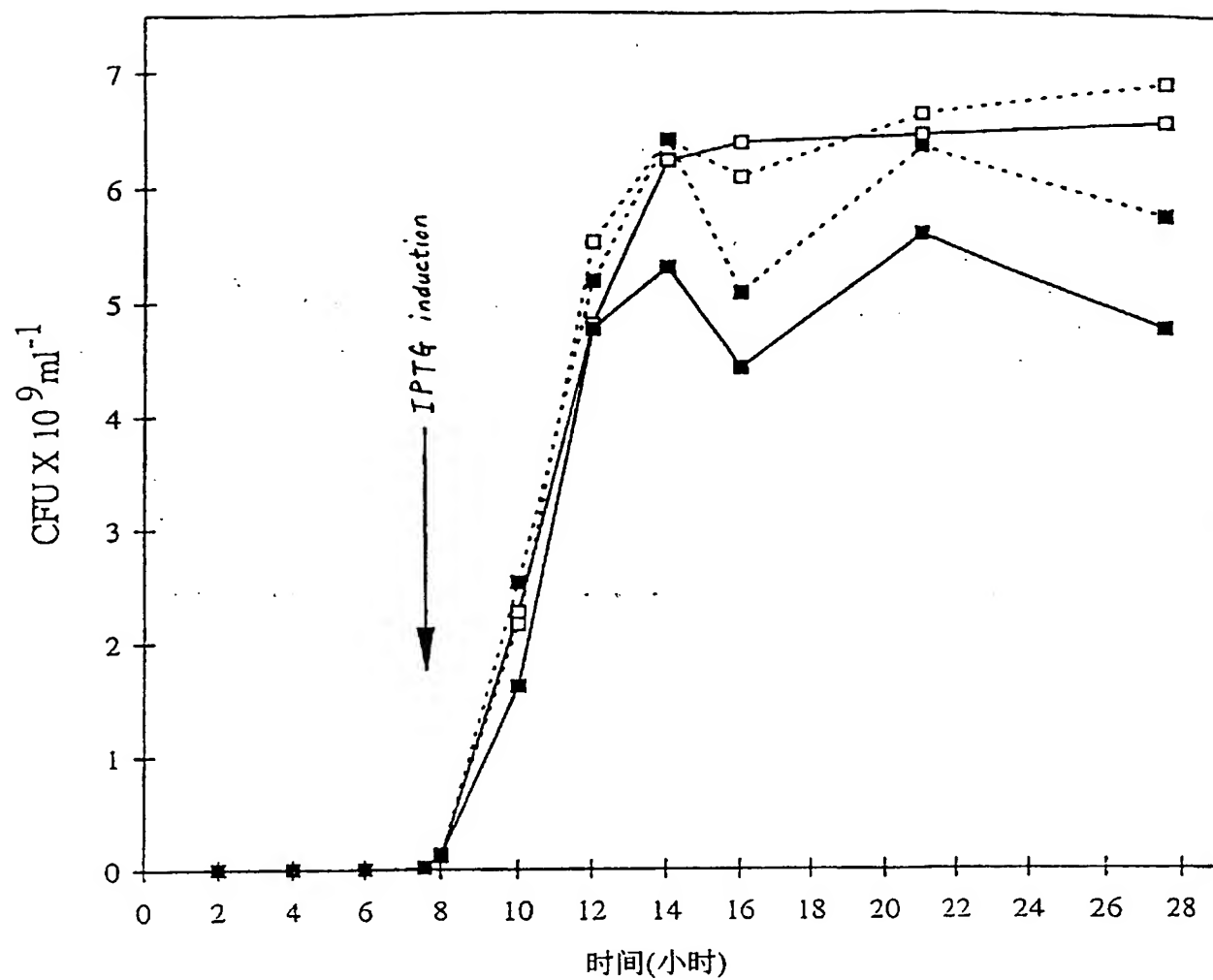




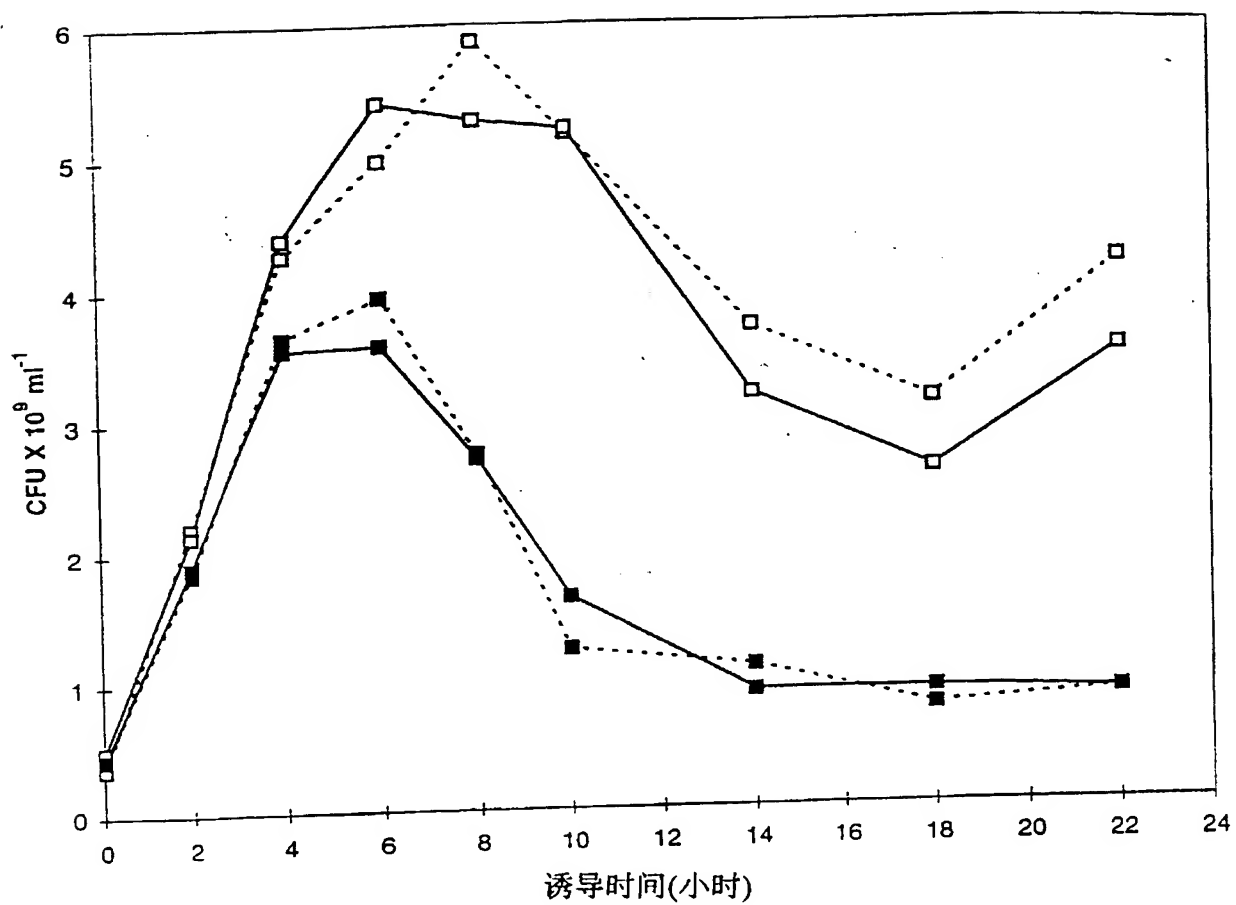
图四



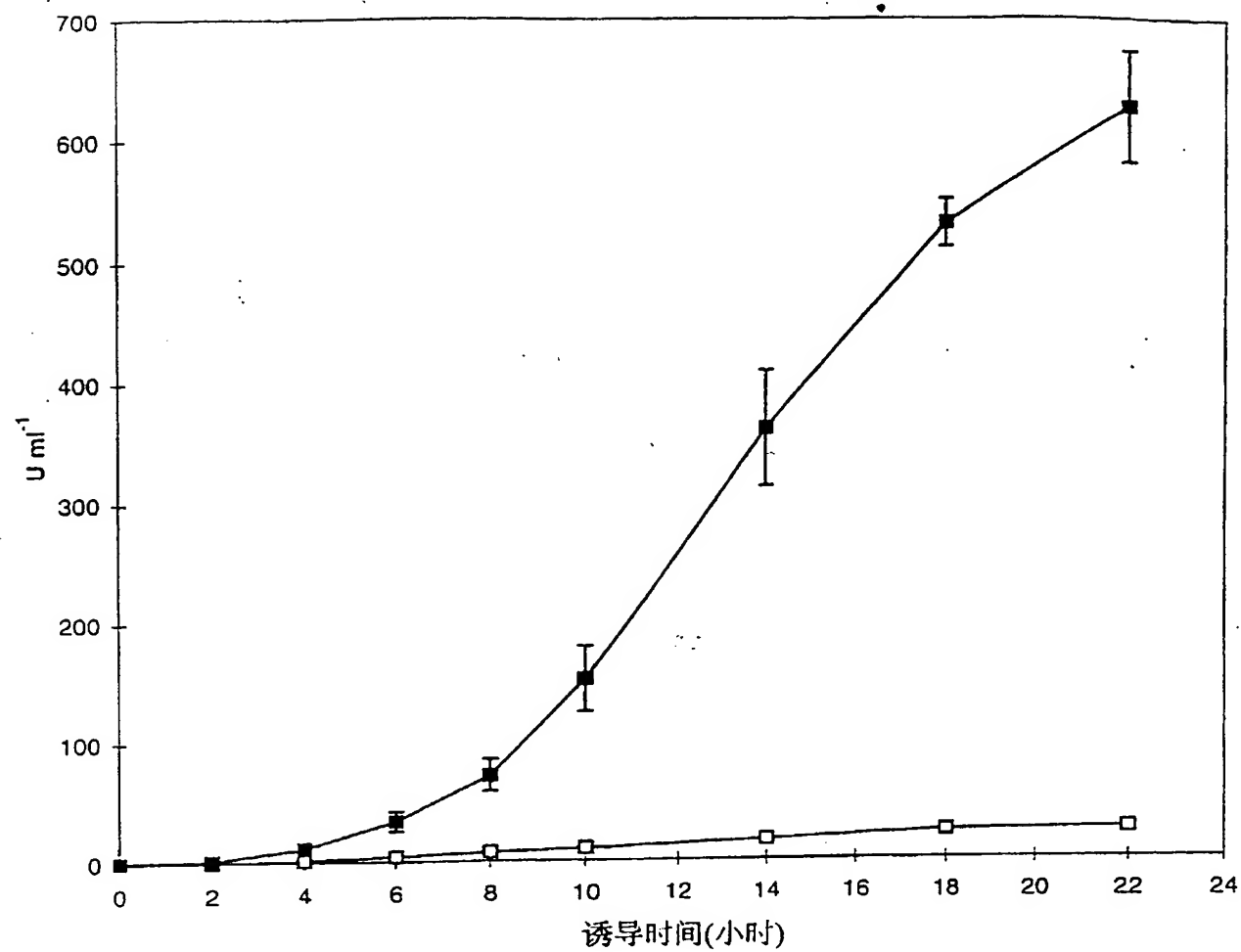
图五



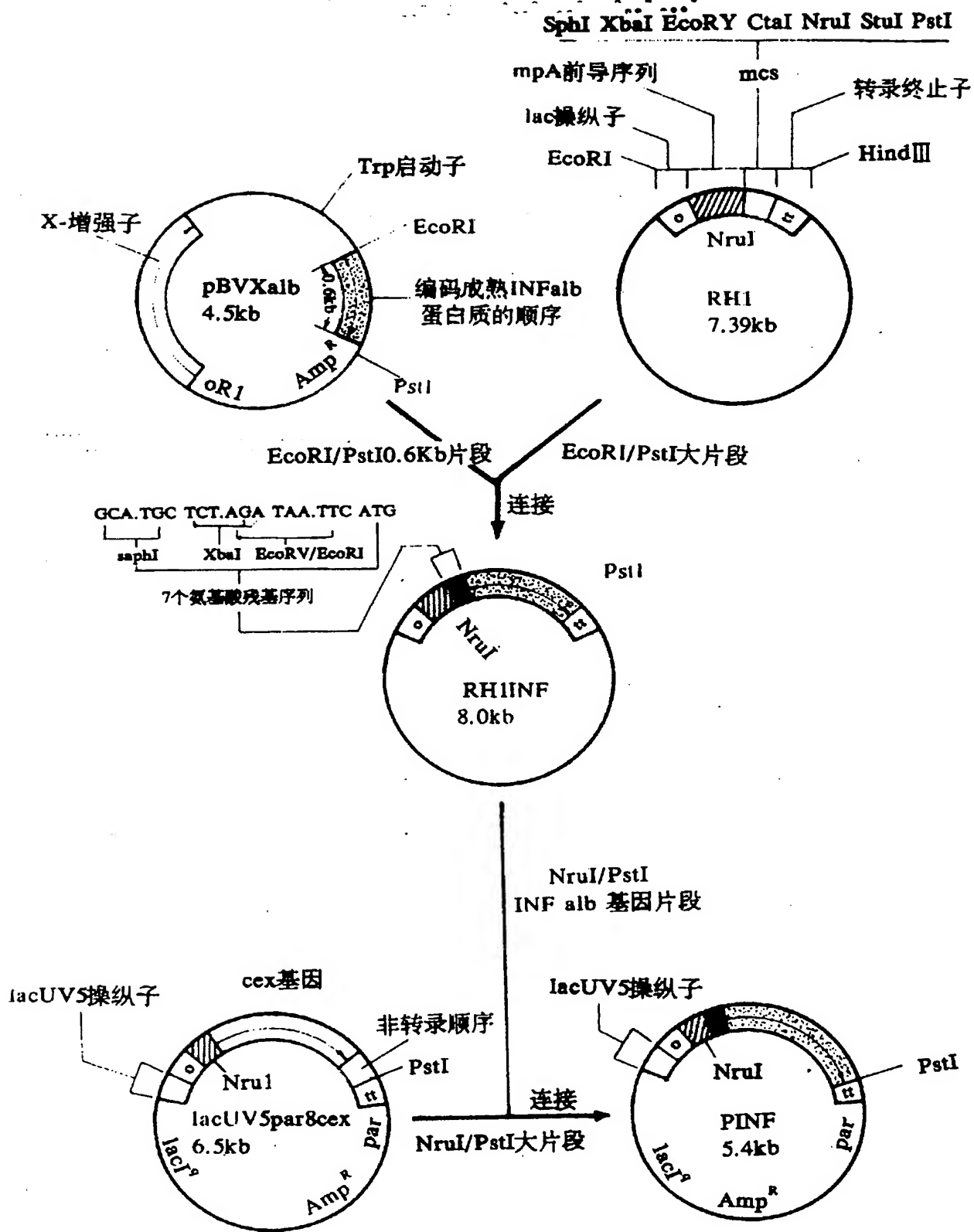
图六



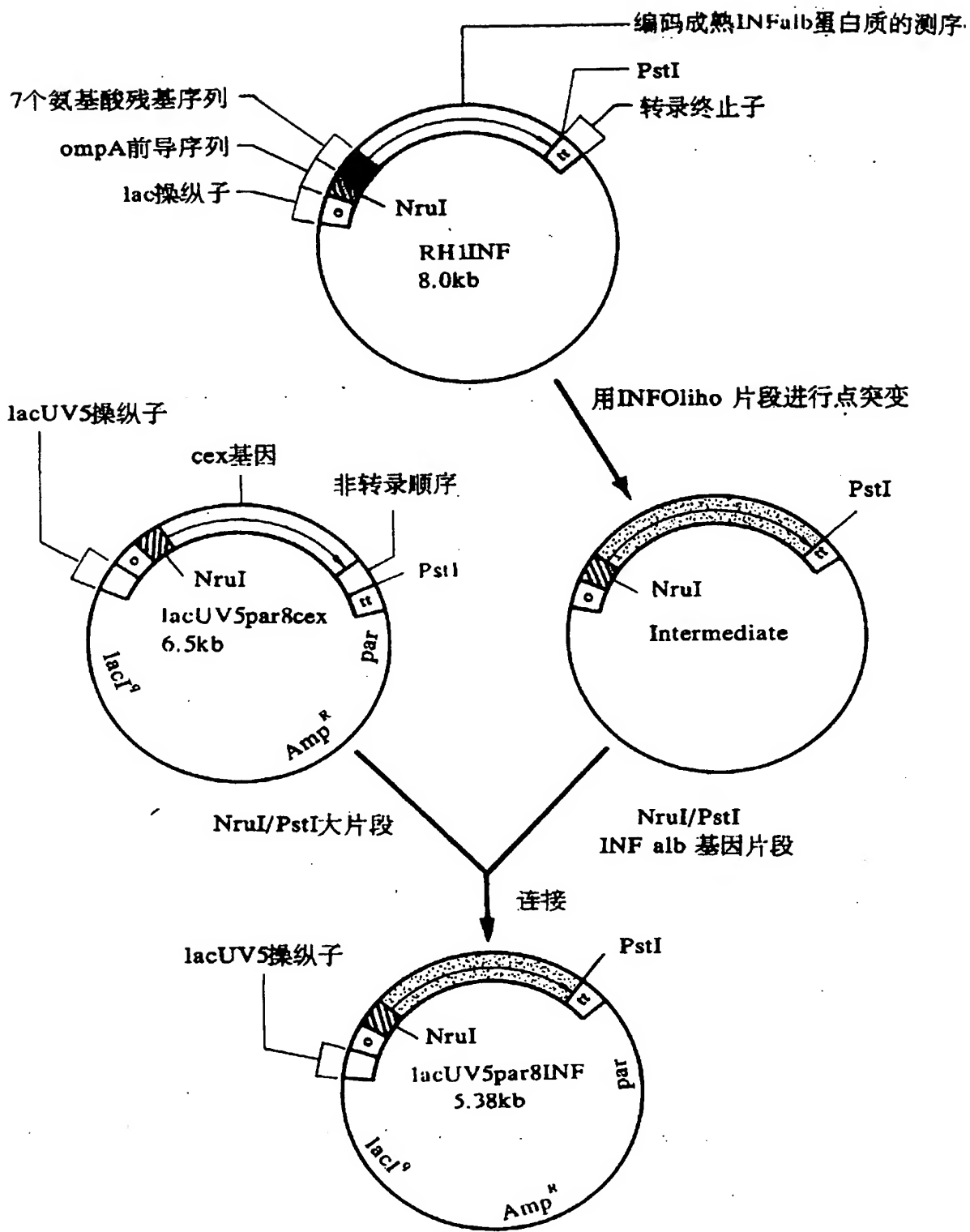
图七



图八



图九



图十

